

Karakterisasi Morfologi dan Isoenzim Aksesori Pamelor [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] Berbiji dan Tidak Berbiji {*Morphological and Isoenzyme Characterization of Seeded and Seedless Pummelo [Citrus maxima* (Burm.) Merr.] Accessions}

Arifah Rahayu¹⁾, Slamet Susanto²⁾, Bambang Sapto Purwoko²⁾, dan Iswari Saraswati Dewi³⁾

¹⁾Program Studi Agroteknologi Universitas Djuanda Bogor, Jln. Tol Ciawi 1, Kotak Pos 35 Ciawi, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16720

²⁾Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB, Jln. Meranti Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

³⁾Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jln Tentara Pelajar 3A, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16111
E-mail: ssanto@cbn.net.id

Diterima: 30 Juni 2015; direvisi: 24 Januari 2017; disetujui: 8 Februari 2017

ABSTRAK. Indonesia memiliki banyak aksesori pamelor dengan beragam bentuk, ukuran, warna, rasa buah, dan jumlah biji. Sampai saat ini belum diketahui karakter yang membedakan antara aksesori pamelor yang berbiji dan tidak berbiji. Penelitian bertujuan mengevaluasi karakter morfologi dan biokimia (isoenzim) aksesori pamelor berbiji dan tidak berbiji asal Sumedang, Kudus, Pati, dan Magetan. Identifikasi morfologi dilakukan menggunakan bagian vegetatif dan reproduktif tanaman pamelor berdasarkan *descriptor list* IPGRI. Analisis isoenzim dilaksanakan dengan menggunakan daun muda, dengan isoenzim esterase (EST), malat dehidrogenase (MDH), peroksidase (PER), asam fosfatase (ACP), dan glutamat oksaloasetat transaminase (GOT). Karakter morfologi yang berperan dalam pengelompokan aksesori pamelor adalah tebal epikarp, pinggir helai daun, panjang kantong jus, warna kulit buah masak, lebar sayap daun, dan bentuk buah, sedangkan karakter isoenzim adalah MDH (Rf 0,11 dan 0,14) dan ACP (Rf 0,24 dan 0,33). Karakter morfologi yang membedakan pamelor berbiji dan tidak berbiji adalah bentuk buah (*pyriform*), inti buah (berongga), dan jumlah biji < 10 per buah, sementara pada isoenzim adalah pita ACP Rf 0,24. Dendrogram berdasarkan karakter morfologi memisahkan kelompok aksesori berbiji dan tidak berbiji pada koefisien kemiripan 0,63, dan berdasarkan isoenzim pada koefisien kemiripan 0,49. Dendrogram berdasarkan karakter morfologi dan isoenzim dapat membedakan antara aksesori berbiji, potensial tidak berbiji, dan tidak berbiji. Hasil pemetaan komponen utama kongruen dengan dendrogram, yaitu dapat memisahkan aksesori berbiji maupun tidak berbiji, berdasarkan karakter morfologi, isoenzim maupun kombinasinya.

Kata kunci: *Citrus maxima* (Burm.) Merr.; Morfologi; Isoenzim; Asam fosfatase; Koefisien kemiripan

ABSTRACT. Indonesia has many pummelo accessions with various shape, size, color, taste, and seeds number of fruit. Up to now characters that can distinguish seeded and seedless pummelo accessions are not yet known well. The objective of this work was to evaluate morphological and biochemical (isoenzyme) characters of seeded and seedless pummelo accessions originated from Sumedang, Pati, Kudus, and Magetan. Morphological identification used vegetative and reproductive component of pummelo tree, based on IPGRI descriptor list. Isoenzyme analysis was done by using young leaves and esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH), peroxidase (PER), acid phosphatase (ACP), as well as glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) isoenzymes. Morphological characters that contributed in grouping pummelo accessions were epicarp thickness, leaf lamina margin, vesicle length, epicarp color, petiole wing width and fruit shape, while isozyme characters were MDH (Rf 0.11 and 0.14) and ACP (Rf 0.24 and 0.33). Fruit shape (*pyriform*), fruit axis (hollow), seeds number (<10) per fruit, and ACP band at Rf 0.24 could be used as marker to differentiate seeded and seedless pummelo accessions. Separation between seeded and seedless accessions can be done based on morphological characters occurred at similarity coefficient of 0.63, while on isoenzyme characters occurred at similarity coefficient of 0.49. Dendrogram based on combined morphological and isoenzyme data was able to differentiate seed bearing and seedless pummelo accessions. Principal component analysis results was congruent with that of morphological, isoenzyme, and combination of them.

Keywords: *Citrus maxima* (Burm.) Merr.; Morphology; Isoenzyme; Acid phosphatase; Similarity coefficient

Pamelor [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] merupakan salah satu jenis jeruk yang berukuran besar dan bermanfaat bagi kesehatan. Kandungan vitamin C buah pamelor relatif tinggi, antara 37,03–57,59 mg/100 ml (Pichaiyongvongdee & Haurenkit 2009), demikian pula kapasitas antioksidan cukup tinggi (Chaiwong & Theppakorn 2010) sehingga efektif dalam menangkalkan radikal bebas.

Di sentra produksi pamelor di Indonesia, terdapat berbagai aksesori dengan beragam bentuk, ukuran,

warna, rasa buah, dan jumlah bijinya. Aksesori pamelor memiliki jumlah biji beragam, berkisar antara 0–194 biji per buah (Rahayu *et al.* 2012). Buah yang tidak berbiji lebih diminati oleh konsumen, karena biji menyebabkan rasa pahit dan merepotkan saat mengonsumsi buah sehingga pengembangan jeruk ke depan diarahkan pada kultivar tidak berbiji (Altaf & Khan 2007).

Upaya pengembangan kultivar tidak berbiji melalui program pemuliaan dan pemanfaatan plasma nutfah,

memerlukan informasi keanekaragaman genetik dan hubungan kekerabatan antarkultivar pamelos. Informasi ini dapat diperoleh melalui karakterisasi. Tahap awal identifikasi tanaman, biasanya dilakukan secara morfologi, karena relatif mudah dalam mengamati perbedaan antara tanaman secara visual. Karakter morfologi merupakan ekspresi fenotipe dari individu dan populasi, diregulasi oleh gen, dan interaksinya dengan lingkungan. Beberapa peneliti telah menggunakan karakterisasi morfologi pada jeruk, antara lain untuk melihat kekerabatan genetik spesies jeruk (Hardiyanto *et al.* 2007) dan untuk mendapatkan kultivar unggul pamelos (Ara *et al.* 2008).

Karakter morfologi yang diamati bersifat kualitatif dan stabil pada berbagai kondisi lingkungan, contohnya warna bunga dan bentuk buah. Kelemahan penanda morfologi dipengaruhi oleh tahap perkembangan tanaman dan lingkungan. Selain itu kadang-kadang sulit membedakan genotipe yang diamati, karena secara morfologi tampak sama. Hal ini terjadi akibat sifat resesif tertutup oleh sifat dominan. Oleh karena itu hasil karakterisasi morfologi perlu didukung dengan metode lain, antara lain dengan analisis isoenzim.

Isoenzim secara langsung dapat menunjukkan perubahan dalam sekuens DNA melalui perbedaan komposisi asam amino, yang akan menyebabkan perubahan dalam mobilitas elektroforesis (Weeden & Wendel 1989). Hal ini merupakan indikator yang baik untuk keragaman genetik. Hasil penelitian Sinaga *et al.* (2007) menunjukkan penggunaan penanda isoenzim dan AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) menghasilkan tingkat kesesuaian yang sangat baik dalam menggambarkan keragaman antaraksesi dan mampu mengelompokkan aksesis manggis secara terpisah dari kerabat dekatnya. Isoenzim dapat mengidentifikasi batang bawah jeruk nuselar dan zigotik (Sykes 2011) dan menduga ketidakserasian sendiri pada berbagai kultivar jeruk (Ngo *et al.* 2011). Sistem isoenzim peroksidase (PER) dan malat dehidrogenase (MDH) dapat menunjukkan polimorfisme pada kultivar *grapefruit* tidak berbiji hasil pembiakan vegetatif (Chacoff *et al.* 2009). Penggunaan isoenzim esterase (EST), MDH, dan asam fosfatase (ACP) dapat mengungkapkan adanya aliran gen yang besar antara gulma *Conyza canadensis* dan *Conyza bonariensis* (Soares *et al.* 2015), sedangkan EST dan PER menunjukkan aliran gen yang tinggi pada gadung liar (*Dioscorea bulbifera*) di lokasi berbeda (Maideliza & Mansyurdin 2007).

Hasil evaluasi Vn *et al.* (2004) di Vietnam menunjukkan sistem isoenzim GOT dapat membedakan kultivar *grapefruit* berbiji dan tidak berbiji. Di lain pihak belum diketahui kemampuan isoenzim dalam

membedakan antara aksesis berbiji dan tidak berbiji pada pamelos.

Penelitian bertujuan mengidentifikasi karakter morfologi dan isoenzim aksesis pamelos yang dapat digunakan sebagai karakter dalam pengembangan pamelos tidak berbiji. Hipotesis penelitian adalah minimal terdapat satu karakter morfologi dan biokimia yang dapat membedakan antara aksesis pamelos berbiji dan tidak berbiji.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Karakterisasi morfologi dilakukan pada bulan April 2010 sampai dengan April 2011. Pengamatan karakter morfologi pohon, daun, dan bunga dilakukan di sentra produksi pamelos di Kabupaten Sumedang, Kudus, Pati, dan Magetan, sedangkan karakter buah diamati di Laboratorium Pascapanen, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB. Analisis isoenzim dilaksanakan pada bulan Maret 2011 di Laboratorium Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan untuk karakterisasi morfologi adalah bagian-bagian vegetatif (daun dewasa dan batang) dan reproduktif (bunga dan buah), sedangkan untuk analisis isoenzim adalah daun muda yang berumur 20–25 hari setelah muncul trubus. Aksesis pamelos yang digunakan sebanyak 14, yaitu asal Sumedang (Cikoneng ST), Magetan (Jawa 1, Jawa 2, Jawa 3, Magetan, Sri Nyonya, Adas Duku, Bali Putih, Nambangan, Bali Merah 1, Bali Merah 2), Kudus (Muria Merah 1, Muria Merah 2), dan Pati (Bageng Taji) yang tumbuh di kebun petani.

Alat yang digunakan dalam karakterisasi morfologi, yaitu pH meter tanah, thermo-higrometer, jangka sorong, dan altimeter. Sementara itu, untuk analisis isoenzim digunakan alat elektroforesis model horisontal, *high voltage power supply*, oven, lemari pendingin, nampan tempat pewarnaan, mortar, alat gelas, timbangan, dan pengaduk elektrik.

Karakterisasi Morfologi

Identifikasi pamelos secara morfologi (pohon, daun, bunga, buah, dan biji) dilakukan berdasarkan *descriptors for citrus* (IPGRI 1999) yang telah dimodifikasi (Tabel 1). Tanaman pamelos yang diamati telah dewasa, berumur lebih dari 6 tahun. Dari tiap lokasi dipilih tiga tanaman contoh. Pengamatan karakter kuantitatif dan kualitatif dievaluasi dari 10

Tabel 1. Daftar karakter morfologi tanaman pamelos (*List of pummelo morphological character*)

Bagian tanaman (<i>Part of plant</i>)	Karakter morfologi (<i>Morphology character</i>)
Pohon (<i>Tree</i>)	Bentuk tajuk, bentuk umum pohon, kerapatan dan sudut percabangan, kerapatan dan bentuk duri, warna, dan permukaan trubus
Daun (<i>Leaf</i>)	Pembagian daun, intensitas warna hijau, perlekatan helai daun, panjang, lebar dan bentuk helai daun, bentuk pinggiran dan ujung daun, lebar, dan bentuk sayap daun
Bunga (<i>Flower</i>)	Panjang tangkai bunga, diameter kelopak bunga, perbandingan panjang anther terhadap stigma, tipe dan warna bunga, jumlah mahkota dan benang sari per bunga, panjang, dan lebar mahkota
Buah (<i>Fruit</i>)	Bobot, diameter, panjang dan bentuk buah, bentuk ujung dan pangkal buah, warna kulit buah (eksokarp) masak, mesokarp dan daging buah, tebal eksokarp dan mesokarp, tekstur permukaan buah, kelekatan antara eksokarp dan mesokarp, kejelasan, kerapatan dan ukuran kelenjar minyak, jumlah segmen, kelekatan antarsegmen, keseragaman bentuk segmen dan ketebalan dinding segmen, intensitas warna daging buah, keseragaman warna pulp, kekerasan dan tekstur daging buah, panjang dan tebal kantong jus, inti buah, jumlah, bentuk, permukaan biji, warna biji, kotiledon, bintik kalaza, dan jumlah embrio per biji
Biji (<i>Seed</i>)	Jumlah biji per buah, bentuk biji, permukaan biji, warna biji, warna kotiledon, warna titik kalaza, embriologi biji, panjang, dan lebar biji

Sumber: IPGRI (1999)

daun, 10 bunga, dan 10 buah dari setiap tanaman. Aksesori pamelos dikelompokkan tidak berbiji (jumlah biji per buah < 10), potensial tidak berbiji (jika dalam satu aksesori terdapat buah berbiji dan tidak berbiji), dan berbiji (jumlah biji per buah ≥ 10).

Penyiapan Gel, Ekstraksi Enzim, Elektroforesis, dan Pewarnaan

Teknik analisis isoenzim esterase (EST), malat dehidrogenase (MDH), peroksidase (PER), dan asam fosfatase (ACP) mengikuti cara Horry (1989), sedangkan glutamat oksaloasetat transaminase (GOT) berdasarkan Wendel & Weeden (1989). Gel dibuat dari 10% pati kentang dengan 225 ml larutan penyangga gel (histidin, tris, dan H₂O). Isoenzim diisolasi dari 100 mg daun muda pamelos ditambah 0,5 ml larutan pengeksktraksi (L-asam askorbat, L-cystein, Triton X-100, PVP, 0.1 M Na₂HPO₄·2H₂O). Larutan enzim diserap dengan kertas saring ukuran 4 mm x 5 mm, kemudian disisipkan dalam potongan gel. Gel dielektroforesis dengan model horisontal pada suhu 4°C selama kurang lebih 4 jam dengan kuat arus stabil (0,25–0,26 mA) dan voltase 50 V pada 30 menit pertama, kemudian 100 V selama 1 jam, selanjutnya dibuat konstan 150 V. Selesai elektroforesis, gel diberi pewarna tiap enzim (Wendel & Weeden 1989) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit di dalam ruang gelap.

Analisis Data

Analisis kemiripan data morfologi dan isoenzim dilakukan melalui fungsi *similarity for qualitative data* (SIMQUAL), sedangkan pengelompokan data matrik dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode *unweighted pair-group method arithmetic* (UPGMA),

dan tingkat kepercayaan dendrogram ditentukan dengan fungsi MxComp menggunakan program NTSYSpc versi 2.02 (Rohlf 1998). Untuk mengurangi jumlah peubah yang akan dianalisis, digunakan analisis komponen utama, dengan mengekstrak nilai ragam dari *eigenvektor* dari *eigenvalue* utama, dengan tingkat keragaman paling tinggi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakter Morfologi Aksesori Pamelos Berbiji dan Tidak Berbiji

Hasil analisis komponen utama terhadap 14 aksesori pamelos, menunjukkan keragaman 70% dari 150 karakter baru diperoleh dari tujuh komponen utama (Tabel 2). Karakter yang paling berperan dalam pengelompokan pamelos terdapat pada daun dan buah (Tabel 3). Hasil yang sama juga disampaikan oleh Quang *et al.* (2011), keragaman yang tinggi pada pamelos *Than tra* dari lima lokasi ditunjukkan oleh karakter pohon, daun, dan buah.

Susandarini *et al.* (2013) melaporkan bahwa karakter daun dan buah dapat memisahkan aksesori pamelos menjadi kelompok pamelos asam dan getir dan pamelos manis. Lebih lanjut Susandarini *et al.* (2013) menyatakan bahwa pamelos asam dan getir antara lain dicirikan dengan jumlah biji banyak, sedangkan pamelos manis memiliki jumlah biji sedikit (5–10) dan sedang (11–20). Hasil penelitian Rahayu *et al.* (2012), menunjukkan bahwa aksesori pamelos berbiji memiliki pH jus buah lebih rendah dan kandungan asam tertitrasi

Tabel 2. Nilai ciri dan dua nilai komponen utama (KU) pertama berdasarkan penanda morfologi (pohon, daun, bunga, dan buah) [*Characteristic values and the first two principal component (PC) values based on morphological marker (tree, leaf, flower, and fruit)*]

No.	Nilai ciri (Characteristic values)	Proporsi (Proportion)	Kumulatif (Cumulative)	Karakter (Character)	KU1 (PC 1)	Karakter (Character)	KU2 (PC 2)
1	3,861	0,164	0,164	TBLEPI3	-0,210	INTI1	0,240
2	3,113	0,132	0,297	PINGHD1	0,195	KLTAJ7	0,206
3	2,791	0,119	0,415	PINGHD3	-0,195	LSD5	0,194
4	2,415	0,103	0,518	PV3	0,187	JB5	0,188
5	2,101	0,089	0,608	LSD3	0,173	KSRGWJ0	0,178
6	1,796	0,076	0,684	WKBH2	0,159	KSRGWJ1	-0,178
7	1,650	0,070	0,754	BTKBH2	0,154	JB1	0,173

TBLEPI3 : Tebal epikarp tipis (*Epicarp thickness thin*) (1,10–1,29 mm)

INTI1 : Inti buah padat (*Fruit axis solid*)

PINGHD1 : Pinggiran helai daun bergerigi (*Leaf lamina margin crenate*)

JB5 : Jumlah biji sedang (*Seed number medium*)(10,0–39,0)

PINGHD3 : Pinggiran helai daun rata (*Leaf lamina margin entire*)

KLTAJ7 : Kelekatan antarjuring kuat (*Adherence of segment walls strong*)

PV3 : Panjang vesicle (kantong jus) panjang (*vesicle length long*)

KSRGWJ0 : Keceragaman warna kantong jus tidak seragam (*Pulp color uniformity not uniform*)

LSD3 : Lebar sayap daun sempit (*Petiole wing width narrow*)

KSRGWJ1 : Keceragaman warna kantong jus seragam (*Pulp color uniformity uniform*)

WKBH2 : Warna kulit buah masak hijau-kuning (*Skin colour of ripe fruit green-yellow*)

BTKBH2 : Bentuk buah ellipsoid (*Fruit shape ellipsoid*)

JB1 : Jumlah biji sedikit (*Seed number low*) (< 4,0)

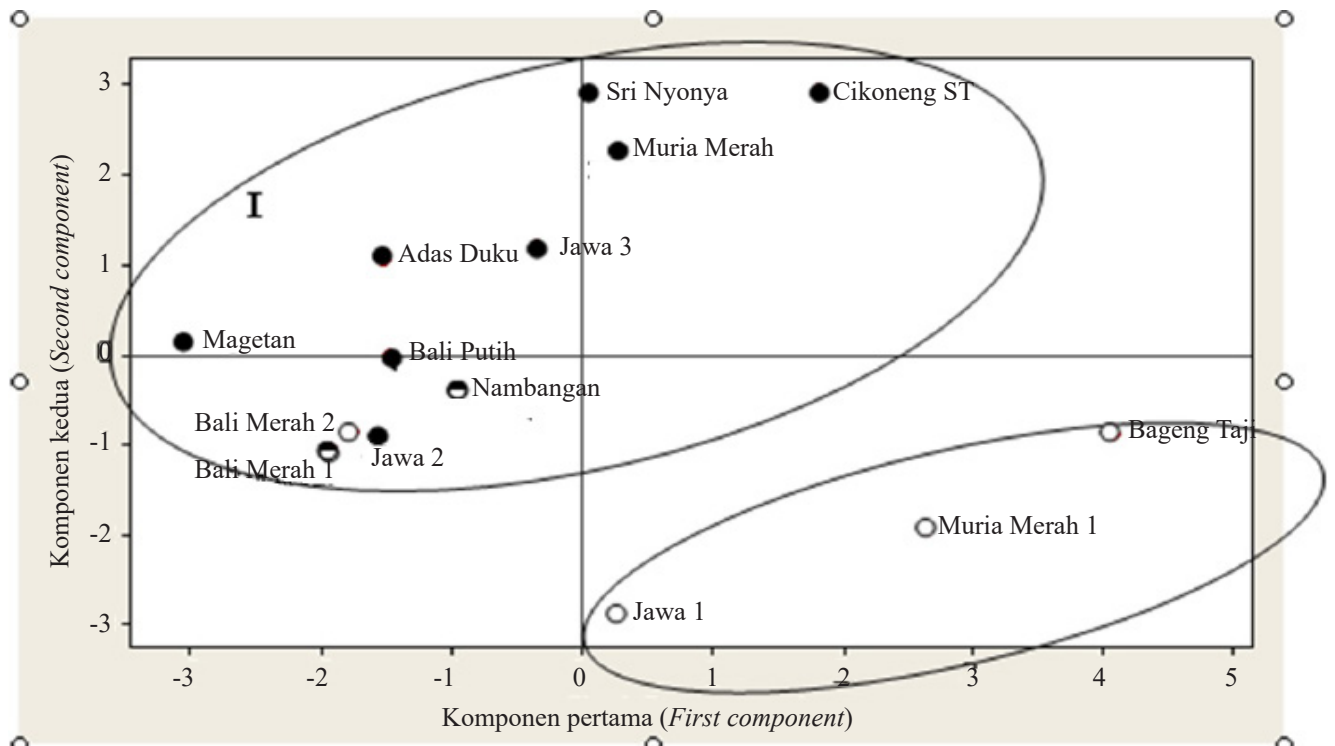
total (ATT) lebih besar sehingga memiliki rasa lebih asam dibandingkan dengan aksesori potensial tidak berbiji dan tidak berbiji.

Hasil pengelompokan berdasarkan jumlah biji, diperoleh delapan aksesori berbiji, dua aksesori potensial tidak berbiji, dan empat aksesori tidak berbiji (Tabel 3). Hasil ekstraksi komponen 1 vs 2 membentuk dua kelompok utama (Gambar 1), yaitu berbiji dan tidak berbiji (kecuali Bali Merah 2). Pengelompokan ini tidak dipengaruhi oleh asal aksesori. Dengan demikian, sifat tidak berbiji pada jeruk amat dipengaruhi oleh genotipe, seperti dilaporkan oleh Fatima *et al.* (2010) pada kultivar jeruk manis dan mandarin. Susandarini *et al.* (2013) juga menyampaikan bahwa jumlah biji termasuk karakter morfologi yang stabil dan keragamannya tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan.

Analisis dengan program NTSYSpC menunjukkan nilai korelasi matriks kesamaan MxComp sebesar $r = 0,7$ (Rohlf 1998). Hasil analisis SIMQUAL menunjukkan antaraksesori pamelos memiliki koefisien kemiripan 48,5–81,1%. Berdasarkan karakter morfologi, tingkat kemiripan tertinggi terdapat pada Bali Merah 1 dan Bali Merah 2. Perbedaan morfologi

utama antarkedua aksesori hanya tampak pada trikoma di permukaan bawah daun, posisi benang sari terhadap putik dan jumlah biji. Selain itu, Bali Merah 2 konsisten menghasilkan <10 biji per buah dengan berbagai metode penyerbukan (Rahayu 2012). Diduga Bali Merah 2 merupakan mutan dari Bali Merah 1, karena mutasi alami pada tanaman buah, terutama apel dan jeruk dapat menghasilkan karakter tidak berbiji (Vardi *et al.* 2008). Yamasaki *et al.* (2009) melaporkan Mukaku Kishu yang tidak berbiji merupakan *bud mutant* dari Kishu yang berbiji.

Karakter morfologi yang hanya terdapat pada pamelos tidak berbiji adalah bentuk buah *pyriform*, kondisi inti buah berongga dan jumlah biji per buah < 4. Dengan demikian, perbedaan antarkultivar pamelos berbiji dan tidak berbiji terutama terdapat pada karakter buah. Hal yang sama dilaporkan oleh Altaf *et al.* (2014), bahwa antara mandarin Kinnow berbiji dan tidak berbiji, berbeda pada karakter bentuk buah, bentuk pangkal buah, dan tekstur permukaan buah. Lebih lanjut, karakter morfologi buah pada tomat juga berkaitan dengan bobot biji, penambahan ukuran memanjang buah berkorelasi negatif dengan bobot biji tomat (Wu *et al.* 2011). Sementara itu



Gambar 1. Analisis komponen utama kemiripan 14 aksesori pamelor menggunakan penanda morfologi yang dipetakan ke dalam bentuk dua sumbu komponen utama yang pertama (*Principal component analysis similarity of 14 pummelo accessions used morphological marker mapped in the form of two major components of the first axis*)

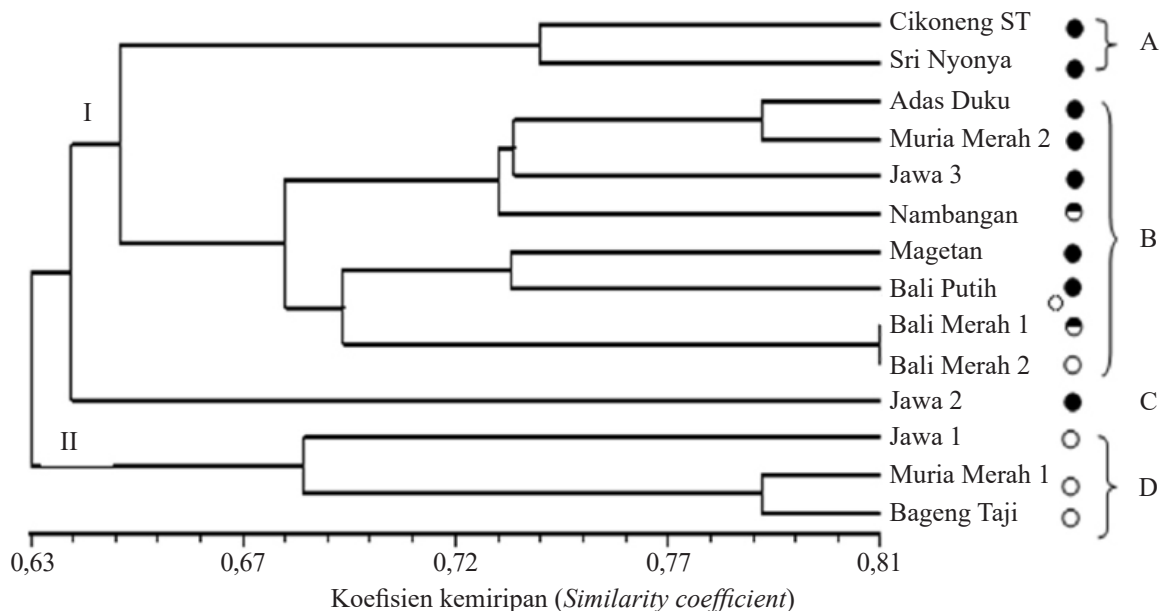
● = berbiji (seeded), ◐ = potensial tidak berbiji (potentially seedless), ○ = tidak berbiji (seedless)

Tabel 3. Pengelompokan aksesori pamelor berdasarkan jumlah biji dan karakter morfologi yang berperan dalam pengelompokan aksesori pamelor (*Grouping pummelo accessions based on number of seeds and morphological characters that play a role in the grouping of pummelo accessions*)

Kelompok aksesori (Group of accession)	Pinggiran daun (Leaf margin)	Lebar sayap daun (Petiole wing width)	Panjang kantong jus (Vesicle length)	Tebal epikarp (Epicarp thickness)	Warna kulit buah masak (Skin color of ripe fruit)	Bentuk buah (Fruit shape)
Berbiji (Seeded)						
Cikoneng ST	Bergerigi	Sedang	panjang	Sedang	hijau-kuning	Ellipsoid
Jawa 2	Rata	Lebar	pendek	Tipis	hijau-kuning	Spheroid
Adas Duku	Rata	Sempit	pendek	Tipis	Kuning	Spheroid
Magetan	Rata	Sempit	pendek	Tipis	kuning tua	ellipsoid- spheroid
Sri Nyonya	Rata	Sedang	panjang	Tebal	hijau-kuning	Spheroid
Bali Putih	Rata	Sempit	pendek	Tipis	hijau-kuning	Spheroid
Muria Merah 2	Bergerigi	Sedang	pendek	Sedang	hijau-kuning	Spheroid
Jawa 3	Rata	Sedang	pendek	Tebal	hijau-kuning	spheroid
Potensial tidak berbiji (Potentially seedless)						
Nambangan	Rata	Sempit	sedang	Tipis	Kuning	spheroid
Bali Merah 1	Rata	Sempit	pendek	Tipis	Hijau	spheroid-pyriform
Tidak berbiji (Seedless)						
Bali Merah 2	Rata	Sempit	pendek	Tipis	Hijau	obloid-spheroid
Jawa 1	Rata	Sempit	sedang	Sedang	hijau-kuning	Pyriform
Muria Merah 1	Bergerigi	Lebar	sedang	Tebal	hijau-kuning	Pyriform
Bageng Taji	Bergerigi	Sedang	sedang	Tebal	hijau-kuning	Pyriform



Gambar 2. Bentuk buah pamelo (a) *ellipsoid* (jorong), (b) *spheroid* (bulat seperti bola), (c) *spheroid-pyriform*: bulat, ujung buah membesar, (d) *pyriform* (seperti pir, pangkal kecil membesar pada bagian ujung buah).



Gambar 3. Dendrogram 14 aksesi pamelo berdasarkan penanda morfologi (*The dendrogram of 14 pummelo accessions based on morphological marker*)

● = berbiji (*seeded*), ⊖ = potensial tidak berbiji (*potentially seedless*), ○ = tidak berbiji (*seedless*) Pada koefisien kemiripan 0,674, kelompok I dibedakan atas tiga subkelompok: A (Cikoneng ST dan Sri Nyonya), B (Adas Duku, Muria Merah 2, Jawa 3, Nambangan, Magetan, Bali Putih, Bali Merah 1 dan Bali Merah 2), dan C (Jawa 2). Kelompok II hanya terdiri atas satu subkelompok D (Jawa 1, Bageng Taji, dan Muria Merah 2) (Gambar 2)

karakter morfologi lemon berbiji dan tidak berbiji hasil iradiasi, selain berbeda dalam bentuk buah dan jumlah segmen per buah juga menunjukkan vigor, jumlah duri, dan kecepatan tumbuh yang tidak sama (Uzun *et al.* 2008).

Hasil pengelompokan dengan UPGMA menghasilkan dendrogram yang memisahkan aksesi atas dua kelompok pada tingkat kesamaan 63,4%. Kelompok I terdiri atas aksesi berbiji dan potensial tidak berbiji, kecuali Bali Merah 2, kelompok II seluruhnya berisi aksesi tidak berbiji (Gambar 3).

Karakter Isoenzim Aksesi Pamelo Berbiji dan Tidak Berbiji

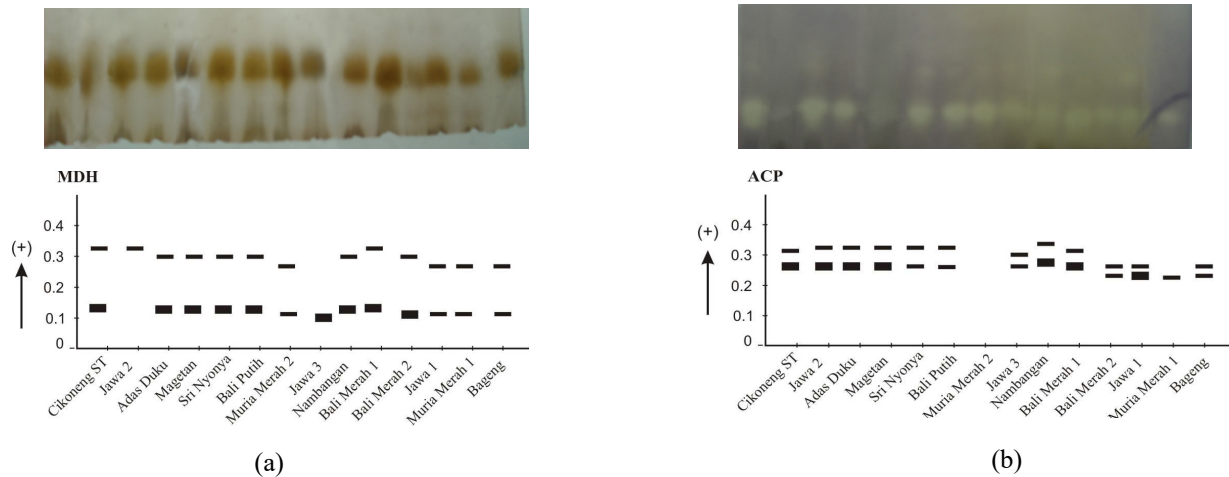
Hasil analisis pada 14 aksesi menunjukkan empat sistem enzim bersifat polimorfik, dengan tingkat polimorfisme tertinggi pada EST, diikuti PER, MDH dan ACP, sedangkan GOT bersifat monomorfik. Hasil

analisis komponen utama (AKU) terhadap 14 aksesi pamelo menunjukkan karakter yang paling berperan terhadap pengelompokan aksesi pamelo adalah MDH (Rf 0,11 dan 0,14), diikuti oleh ACP (Rf 0,24 dan 0,33), berturut-turut sebesar 0,418, 0,411, 0,352 dan 0,344 (Tabel 4).

Keragaan dan zimogram hasil analisis isoenzim ditampilkan pada Gambar 3 dan hasil analisis komponen utama ini dipetakan pada Gambar 4, yang mengelompokkan aksesi pamelo atas berbiji dan tidak berbiji (kecuali Muria Merah 2). Masuknya Muria Merah 2 pada kelompok tidak berbiji, karena memiliki pita MDH 0,11, sehingga karakter yang benar-benar spesifik membedakan aksesi tidak berbiji adalah ACP 0,24. Hal ini membuat isoenzim ACP potensial digunakan untuk membedakan aksesi pamelo tidak berbiji. Sementara Van *et al.* (2004) melaporkan, bahwa enzim yang dapat membedakan

Tabel 4. Nilai ciri dan dua nilai komponen utama (KU) pertama berdasarkan penanda isoenzim (EST, PER, MDH, dan ACP) [Characteristic values and the first two principal component (PC) values based on isoenzyme marker (EST, PER, MDH, and ACP)]

No.	Nilai ciri (Characteristic values)	Proporsi (Proportion)	Kumulatif (Cumulative)	Karakter (Character)	KU1 (PC 1)	Karakter (Character)	KU2 (PC 2)
1	1,291	0,298	0,295	MDH011	0,418	EST019	0,387
2	0,683	0,156	0,451	MDH014	0,411	PER010	0,336
3	0,547	0,125	0,576	ACP024	0,352	MDH030	0,330
4	0,513	0,117	0,694	ACP033	0,344	ACP033	0,322



Gambar 4. Pola pita isoenzim (a) MDH dan (b) ACP pada 14 aksesori pamelor [Isoenzyme banding pattern (a) MDH and (b) ACP on the 14 pummelo accessions]

aksesi *grapefruit* berbiji dan tidak berbiji adalah GOT. Dengan demikian, diduga isoenzim yang sesuai untuk membedakan aksesori berbiji dan tidak berbiji akan berbeda pada tiap spesies.

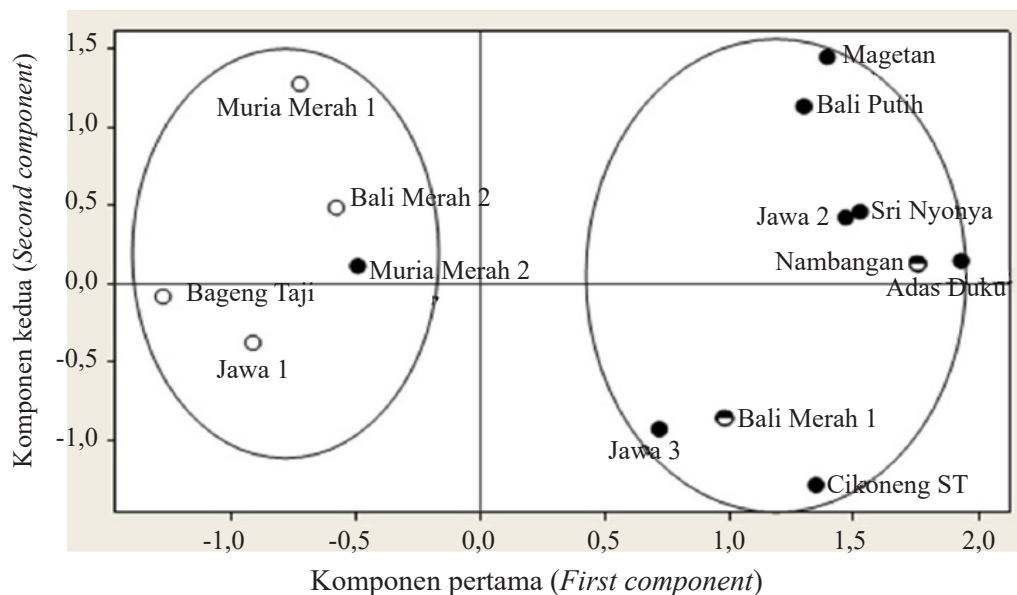
Berdasarkan analisis SIMQUAL, diketahui pengelompokan aksesori pamelor berdasarkan karakter isoenzim terbentuk pada tingkat kemiripan 22,2–94,7%. Hal ini menunjukkan rentang tingkat kemiripan dari penanda isoenzim (72,5%), berbeda jauh dengan penanda morfologi (32,6%). Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Sinaga *et al.* (2007), bahwa isoenzim mampu mengungkap keragaman 33 aksesori manggis dengan polimorfisme tinggi dan pengelompokan manggis dengan kerabat liarnya terbentuk pada tingkat kemiripan 14–96%. Dengan demikian, isoenzim dapat mengungkapkan keragaman yang lebih besar antaraksesori pamelor sehingga penggunaan isoenzim yang tepat dapat membedakan aksesori pamelor berbiji dan tidak berbiji lebih baik dibandingkan dengan penanda morfologi.

Kemampuan isoenzim dalam menganalisis keragaman genetik ini, disebabkan karena pola pita yang dihasilkan dalam analisis isoenzim menggambarkan fenotipe elektroforetik (Wendel & Weeden 1989). Hal ini ditunjukkan oleh korelasi antara keragaman isoenzim dengan fase pertumbuhan tanaman merbau (*Intsia bijuga* O.Ktze) di lapangan (Mahfudz 2013).

Pada tanaman padi, analisis isoenzim peroksidase menghasilkan zimogram berbeda antara varietas padi yang toleran dan peka terhadap kadmium (Chang *et al.* 2012). Hasil analisis isoenzim juga berkontribusi cukup besar terhadap penyusunan diagram fenetik pada berbagai varietas tanaman mentimun (Julisaniah *et al.* 2008). Hasil penelitian Hailu *et al.* (2014) menunjukkan analisis isoenzim dapat menampilkan keragaman di dalam dan antarpopulasi tanaman alang-alang, dan hasil analisisnya tidak dipengaruhi oleh ketinggian tempat.

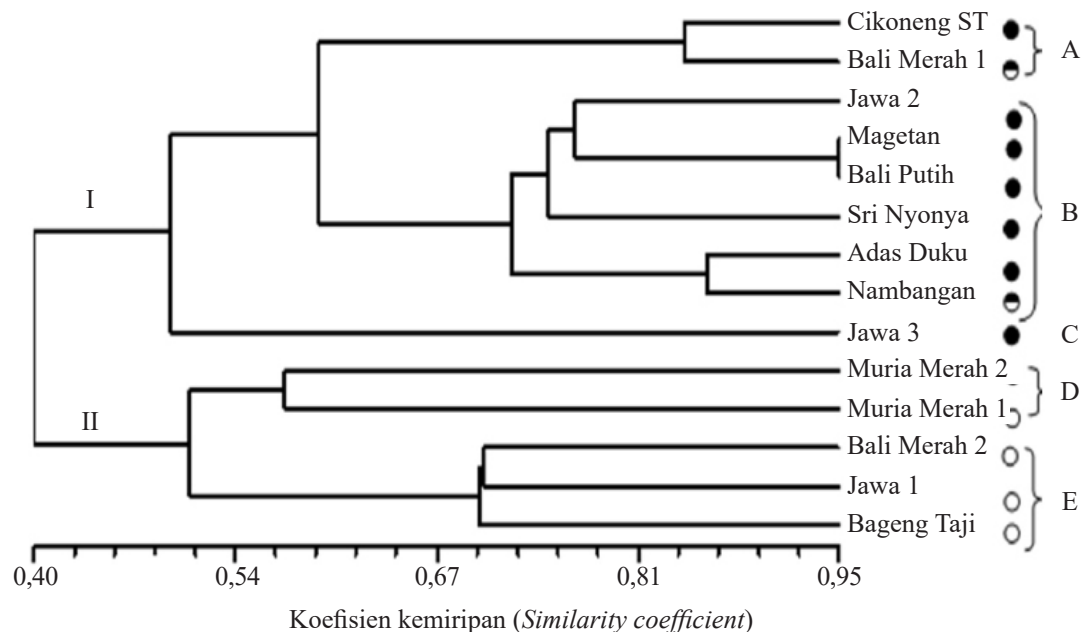
Keragaman genetik antaraksesori pamelor yang cukup besar juga disebabkan oleh monoembrioni (Kainth & Grosser 2010) sehingga embrio yang didapat bersifat zigotik dan memiliki keragaman genetik lebih tinggi dibandingkan dengan spesies jeruk poliembrioni. Selain itu keragaman genetik antarindividu dalam populasi dan antarkultivar pada jeruk secara alami dapat terjadi melalui hibridisasi, adaptasi terhadap lingkungan, dan mutasi. Beberapa kultivar jeruk manis yang ada saat ini berasal dari bibit yang mengalami mutasi somatik, sebagai contoh Baianincha berasal dari Baia yang merupakan mutasi somatik dari jeruk manis Seleta (Machado *et al.* 2011).

Analisis dengan program NTSYSpc pada karakterisasi dengan isoenzim menunjukkan nilai



Gambar 5. Analisis komponen utama kemiripan 14 aksesori pamelu menggunakan penanda isoenzim yang dipetakan ke dalam bentuk dua sumbu komponen utama yang pertama (*Principal component analysis similarity of 14 pummelo accessions used isoenzyme marker mapped in the form of two major components of the first axis*)

● = berbiji (seeded), ◐ = potensial tidak berbiji (potentially seedles), ○ = tidak berbiji (seedless)



Gambar 6. Dendrogram 14 aksesori pamelu berdasarkan penanda isoenzim (*Dendrogram of 14 pummelo accessions based on isoenzyme marker*)

● = berbiji (seeded), ◐ = potensial tidak berbiji (potentially seedles), ○ = tidak berbiji (seedless)

korelasi matriks kesamaan MxComp sebesar $r = 0,895$, yang lebih tinggi dibandingkan dengan karakterisasi morfologi (0,696). Dengan demikian, dendrogram yang dihasilkan dianggap lebih sesuai menggambarkan pengelompokan aksesori pamelu (Rohlf 1998). Dari hasil pengelompokan diperoleh dendrogram yang pada koefisien kemiripan 0,49 memisahkan berbagai aksesori pamelu menjadi dua kelompok. Kelompok I terdiri atas

sembilan aksesori berbiji dan potensial tidak berbiji dan kelompok II terdiri atas empat aksesori tidak berbiji dan satu aksesori berbiji (Gambar 6).

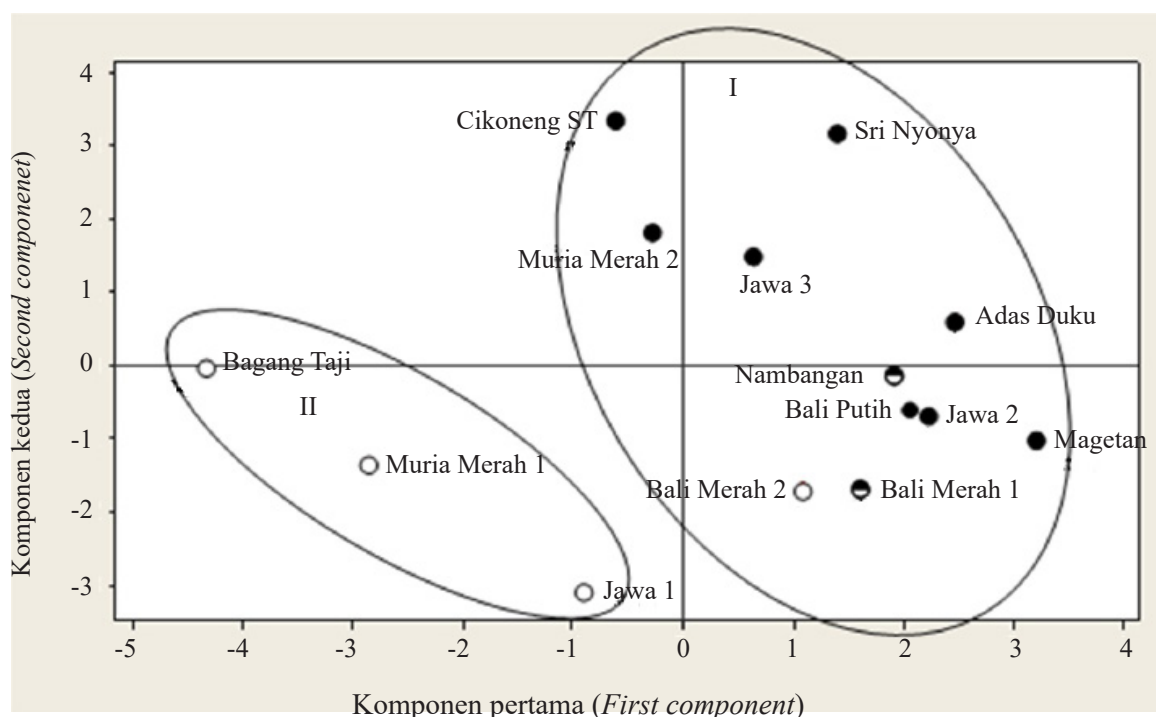
Karakter Gabungan Penanda Morfologi dan Isoenzim

Hasil analisis komponen utama pada karakter gabungan morfologi dan isoenzim menunjukkan

Tabel 5. Nilai ciri dan dua nilai komponen utama (KU) pertama berdasarkan penanda morfologi dan isoenzim (EST, PER, MDH, dan ACP) (*Characteristic values and the first two principal component (PC) values based on morphological and isoenzyme marker (EST, PER, MDH, and ACP)*)

No.	Nilai ciri (Characteristic values)	Proporsi (Proportion)	Kumulatif (Cumulative)	Karakter (Character)	KU1 (PC1)	Karakter (Character)	KU2 (PC2)
1	4,934	0,175	0,175	TBLEPI1	0,182	KLTAJ7	0,208
2	3,776	0,134	0,309	ACP033	0,170	LSD	0,196
3	3,264	0,116	0,425	MDH014	0,168	PER016	0,195
4	2,960	0,105	0,529	MDH011	0,168	JB5	0,187
5	2,718	0,096	0,626	ACP024	0,154	KLTAJ5	0,164
6	2,163	0,077	0,703	JB1	0,154	PB5	0,164

TBLEPI3 : Tebal epikarp tipis (*Epicarp thickness thin*) (1,10-1,29 mm)
 JB1 : Jumlah biji (*Seed number*) 0,0–9,0
 KLTAJ5 : Kelekatan antarjuring sedang (*Adherence of segment walls medium*)
 JB5 : Jumlah biji (*Seed number*) 10,0–39,0
 KLTAJ7 : Kelekatan antarjuring kuat (*Adherence of segment walls strong*)
 PB5 : Panjang biji sedang (*Seed length medium*)

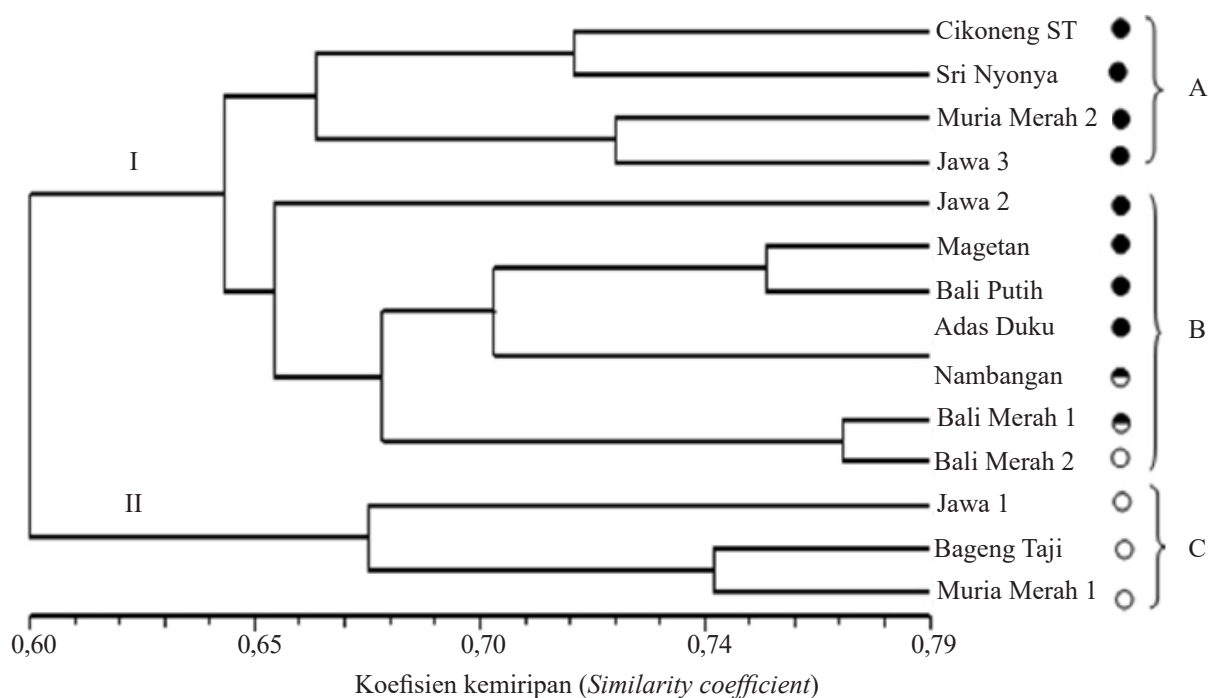


Gambar 7. Analisis komponen utama kemiripan 14 aksesori pamelor menggunakan penanda morfologi dan isoenzim yang dipetakan ke dalam bentuk dua sumbu komponen utama yang pertama (*Principal component analysis similarity of 14 pummelo accessions used morphology and isoenzyme marker mapped in the form of two major components of the first axis*)

● = berbiji (*seeded*), ○ = potensial tidak berbiji (*potentially seedless*), ○ = tidak berbiji (*seedless*)

keragaman sebesar 70% baru diperoleh dari enam komponen utama. Enam karakter yang berperan terhadap pengelompokan aksesori pamelor adalah tebal epikarp, ACP (Rf 0,33), MDH (Rf 0,14), MDH (Rf 0,11), ACP (Rf 0,24), dan jumlah biji sedikit (kurang dari 10) (Tabel 5). Hasil pemetaan dengan

analisis komponen utama, menghasilkan peta yang memisahkan aksesori berbiji dan tidak berbiji (Gambar 7). Komposisi ini hampir sama dengan yang dihasilkan oleh karakterisasi morfologi, yaitu aksesori tidak berbiji kecuali Bali Merah 2 yang membentuk kelompok terpisah dari aksesori berbiji (Gambar 1).



Gambar 8. Dendrogram 14 aksesori pamelu berdasarkan penanda morfologi dan isoenzim (*Dendrogram of 14 pummelo accessions based on morphology and isoenzyme marker*)
 ● = berbiji (seeded), ◐ = potensial tidak berbiji (potentially seedless), ○ = tidak berbiji (seedless)

Analisis pengelompokan dengan UPGMA menghasilkan dendrogram yang pada koefisien kemiripan 0,64 memisahkan aksesori pamelu menjadi dua kelompok. Pada koefisien kemiripan 0,65 kelompok I yang terdiri atas aksesori berbiji dan potensial tidak berbiji, sedangkan kelompok II hanya terdiri atas subkelompok C (Jawa 1, Bageng Taji, dan Muria Merah 1) yang seluruhnya berupa aksesori tidak berbiji. Selain itu antara kelompok aksesori berbiji, potensial tidak berbiji, dan berbiji tersusun secara berurutan (Gambar 8).

Berdasarkan karakter morfologi, gabungan morfologi dan isoenzim, Muria Merah 1 dan Bageng Taji memiliki tingkat kemiripan relatif tinggi. Diduga kedua aksesori ini berasal dari induk yang sama. Hal ini didukung oleh informasi bahwa lokasi penanaman kedua aksesori ini yang saling berdekatan (di kaki Gunung Muria). Selain itu berdasarkan sejarah, Bageng Taji berasal dari bibit yang dibawa dari Kudus (Dinas Pertanian Tanaman Pangan dan Peternakan Kabupaten Pati dan Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Jawa Tengah 2009).

KESIMPULAN DAN SARAN

Karakter morfologi yang berperan dalam pengelompokan aksesori pamelu adalah tebal epikarp, pinggiran helai daun, panjang kantong jus, warna kulit buah masak, lebar sayap daun, dan bentuk buah, sedangkan karakter isoenzim adalah MDH (Rf0,11 dan

0,14) dan ACP (Rf 0,24 dan 0,33). Karakter morfologi yang membedakan pamelu berbiji dan tidak berbiji, yaitu bentuk buah (*pyriform*), inti buah (berongga) dan jumlah biji per buah, sedangkan pada isoenzim adalah pita ACP Rf 0,24. Dendrogram berdasarkan karakter morfologi memisahkan kelompok aksesori berbiji dan tidak berbiji pada koefisien kemiripan 0,63, dan berdasarkan hasil analisis isoenzim diperoleh kelompok aksesori berbiji dan tidak berbiji pada koefisien kemiripan 0,49. Dendrogram berdasarkan karakter morfologi dan isoenzim dapat membedakan antara aksesori berbiji, potensial tidak berbiji dan tidak berbiji. Hasil pemetaan komponen utama kongruen dengan dendrogram, yaitu dapat memisahkan aksesori berbiji maupun tidak berbiji, berdasarkan karakter morfologi, isoenzim maupun kombinasinya.

Implikasi penelitian ini adalah pendugaan aksesori pamelu berbiji dan tidak berbiji dapat dilakukan lebih awal menggunakan analisis isoenzim.

DAFTAR PUSTAKA

1. Altaf, N & Khan, AR 2007, 'The seedless trait in kinnow fruit', *Pak. J. Bot.*, vol. 39, pp. 2003-8.
2. Altaf S, Khan, MM, Jaskani, MJ, Khan, IA, Usman, M, Sadia, B, Awan, FS, Ali, A & Khan, AI 2014, 'Morphogenetic characterization of seeded and seedless varieties of Kinnow Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)', *Aust. J. Crop Sci.*, vol. 8, pp 1542-9.

3. Ara, N, Bashar, MK, Kalim Udin, MD & Khalequzzaman, KM 2008, 'Evaluation of pummelo, *Citrus grandis* L. cultivars in northern area of Bangladesh', *J. Agric. Res.*, vol. 46, pp 65-75.
4. Chacoff, NP, Souto, CP, Aizen, MA & Premoli, A 2009, 'Is there genetic variation in seedless Argentinean grapefruit? Implications for crop production and conservation', *J. Basic & Appl. Gen.*, vol pp. 27-35.
5. Chaiwong, S & Theepakorn, T 2010, 'Bioactive compounds and antioxidant capacity of pink pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) cv "Thong dee" in Thailand', *J. ISSAAS*, vol. 16, pp 10-16.
6. Chang, ML, Chen, NY, Liao, LJ, Cho, CL & Liu, ZH, 2012, 'Effect of cadmium on peroxidase isozyme activity in roots of two *Oryza sativa* cultivars', *Botanical Studies*, vol. 53, pp. 31-44.
7. Dinas Pertanian Tanaman Pangan dan Peternakan Kabupaten Pati dan Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Jawa Tengah 2009, *Proposal usulan pelepasan jeruk pameloh bageng dari Kabupaten Pati*, Dinas Pertanian Tanaman Pangan dan Peternakan Kabupaten Pati.
8. Fatima, B, Usman, M, Khan, IA, Khan, MS & Khan, MM 2010, 'Exploring citrus cultivars for underdeveloped and shrivelled seeds: A valuable resource for spontaneous polyploidy', *Pak. J. Bot.*, vol. 42, pp 189-200.
9. Hailu, HW, Kristiyanto, DH, Alatawi, ARA & Rqib, SM 2014, 'Isozyme electrophoresis and morphometric comparison of reed (*Imperata cylindrical*) adaptation to different altitudes', *Int. J. Innovative Res. Sci. Engineering & Technol.*, vol. 3, pp. 12387-94.
10. Hardiyanto, Mujiarto, E & Sulasmi, ES 2007, 'Kekerabatan genetik beberapa spesies jeruk berdasarkan taksonometri', *J. Hort.*, vol 17, hlm 203-6.
11. Horry, JP 1989, 'The genetic structure of wild and cultivated bananas as perceived through isozymes variation', dalam Horry, JP (ed.), *Chemiotaxonomie et organization genetic dans le genre Musa*, Universite De-Paris-SUD, Centre D'Orsay, Paris.
12. International Plant Genetic Research Institute 1999, *Descriptors for citrus*, International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
13. Julisaniah, NI, Sulistyowati, L & Sugiharto, A, 2008, 'Analisis kekerabatan mentimun (*Cucumis sativus* L.) menggunakan metode RAPD-PCR dan isozim', *Biodiversitas*, vol. 9, hlm. 99-102.
14. Kainth, D & Grosser, JW, 2010, 'Induction of autotetraploids in pummelo (*Citrus grandis* L. Osbeck) through colchicine treatment of eristematically active seeds in vitro', *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, vol. 123, pp. 44-8.
15. Machado, MA, Cristofani-Yaly, M & Bastianel, M 2011, 'Breeding, genetic and genomic of citrus for disease resistance', *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, vol. Especial, E, pp. 158-72.
16. Mahfudz 2013, 'Hubungan antara keragaman dengan isoenzim dan pertumbuhan merbau', *Info BPK Manado*, vol. 3, hlm. 103-12.
17. Maideliza, T & Mansyurdin, 2007, 'Keragaman alel gadung liar (*Dioscorea bulbifera* L.) di Sumatera Barat', *Makara, Sains*, vol.11, hlm. 23-7.
18. Ngo, BX, Kim, JH, Wakana, A, Isshiki, S & Mori, T 2011, 'Estimation of self-incompatibility genotypes of citrus cultivars with Got-3 allozyme markers', *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, vol. 80, pp. 284-94.
19. Pichaiyongvongdee, S & Haruenkit, R 2009, 'Comparative studies of limonin and naringin distribution in different parts of pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) cultivars grown in Thailand', *Kasetsart J. (Nat Sci)*, vol. 43, pp. 28-36.
20. Quang, HT, Xuan, LT, Mai, NT, Trung, NV, Lien, NTT, Phuong, TTB & Loc, NH 2011, 'Genetic variability of "Thanh tra" pummelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) at Thua Thien Hue, Vietnam', *Ann Biol. Res.*, vol. 2, pp. 306-14.
21. Rahayu, A 2012, 'Karakterisasi dan evaluasi aksesori pameloh {(*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) berbiji dan tidak berbiji asli Indonesia}', Disertasi Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
22. Rahayu, A, Susanto, S, Purwoko, BS & Dewi, IS 2012, 'Karakter morfologi dan kimia kultivar pameloh (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) berbiji dan tanpa biji', *J. Agron. Indonesia*, vol. 40, hlm. 49-56
23. Rohlf, FJ 1998, *NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.02*, Exeter Publications. New York.
24. Sinaga, S, Sobir, Perwanto, R, Aswidinnoor, HR, Durjadi, D, Resmitasari, Lukman, R & Amelia, R, 2007, 'Aplikasi marka isoenzim, RAPD, dan AFLP untuk identifikasi variabilitas genetik tanaman manggis (*Garcinia mangostana*) dan kerabat dekatnya', *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian yang Dibiayai oleh Hibah Kompetitif*, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, Hlm. 247-55.
25. Soares, AAF, Fregonezi, AMDT, Bassi, D, Mangolin, CA, de Oliveira Collet, SA, de Oliveira Junior, RS & da Silva Machado, MFP 2015, 'Evidence of high gene flow between samples of horseweed (*Conyza canadensis*) and hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) as revealed by isozyme polymorphisms', *Weed Sci.*, vol. 63, pp. 604-12.
26. Sykes, SR 2011, 'Characterisation of citrus rootstock germplasm introduced as seeds to Australia from the people's Republic of China', *Sci. Hort.*, vol. 127, pp. 298-304.
27. Susandarini, R, Subandiyah, S, Rugayah, Daryono, BS & Nugroho, LH 2013, 'Assessment of taxonomic affinity of Indonesian pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) based on morphological characters', *Amer. J. Agric. Biol. Sci.*, vol. 8, pp. 182-90.
28. Uzun, A, Gulsen, O, Kafa, G & Seday, U, 2008, 'Alata, Gulsen, and Uzun seedless lemons and Eylul early-maturing lemon', *Hort Sci.*, vol. 43, pp. 1920-1.
29. Van, DT, Hai, VM, Stackelberg, MV, Jacobsen, HJ, Dang, BQ & Hung, LV 2004, 'Preliminary results of research for identification the linking between isozymes and seedless characterization of Grape-fruit (Pummelo) in Vietnam', *Sci. Technol. J. Agric. Rural Dev.*, vol. 8, pp. 1082-4.
30. Vardi, A, Levin A & Carmi N 2008, 'Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches', *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol 133, pp. 117-26.
31. Weeden, NF & Wendel, JF, 1989, 'Genetics of plant isozymes', dalam Soltis DE & Soltis PS (ed.), *Isozyme in Plant Biology*, Dioscorides Press, Oregon, pp. 46-72.
32. Wendel, JF & Weeden, NF 1989, 'Visualization and interpretation of plant isozymes', dalam Soltis, DE & Soltis, PS (ed.), *Isozymes in plant biology*, Dioscorides Press, Oregon, pp 5-45.

33. Wu, S, Xiao, H, Cabrera, A, Meulia, T & van der Knaap, E, 2011, *SUN regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns*, diunduh 1 Pebruari 2017, <<http://www.plantphysiol.org>>.
34. Yamasaki, A, Kitajima, N, Ohara, N, Tanaka, M & Hasegawa, K 2009, 'Characteristics of arrested seeds in Mukaku Kishu-type seedless citrus', *J. Jpn. Soc. Hort. Sci.*, vol. 78, pp. 61-7.